动 物 学 研 究 2008，Oct. 29(5)：503—510 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2008.05503

电镜分析非晶状体 βγ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物在人红细胞膜上的孔道形成效应

刘树柏[1,2,#]，何英英[1,2,#]，钱金桥[1,2,3]，张 云[1,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室，生物毒素研究室，云南 昆明 650223；
2. 中国科学院研究生院，北京 100049；3. 昆明医学院第一附属医院 麻醉科，云南 昆明 650032)

摘要：非晶状体 βγ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物(non-lens βγ-crystallin and trefoil factor complex，βγ-CAT)是一个从大蹼铃蟾 (*Bombina maxima*) 皮肤分泌物中分离的天然分子量为 72kDa 的全新的蛋白复合物。本研究测定了 βγ-CAT 处理红细胞后引起细胞内钾离子外流与溶血效应的时效曲线，结合扫描电子显微镜和透射电子显微镜分析 βγ-CAT 处理红细胞引起的早期形态学变化。结果表明：βγ-CAT(3 nmol/L)37℃处理红细胞 5 min，（93.31±5.89）%的细胞内钾离子迅速外流(P<0.01)，相应溶解率为（13.12±1.92）% (P<0.05)。电子显微镜观察发现红细胞形态发生明显变化，细胞体积增加，肿胀。少数红细胞表面向外形成棘状异常突起，部分肿胀细胞内的血红蛋白通过棘状突起缺口向细胞外喷射血红蛋白。表明 βγ-CAT 通过在红细胞膜上形成孔道使细胞内钾离子迅速外流导致红细胞内渗透压改变而溶血。其结果为理解βγ-CAT 的溶血机制提供了直接的形态学证据。

关键词：三叶因子；非晶状体 βγ-晶状体蛋白；非晶状体 βγ-晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物；孔道形成蛋白；扫描电子显微镜；投射电子显微镜
中图分类号：Q959.5；Q51 **文献识码：**A **文章编号：**0254-5853-(2008)05-0503-08

Electron Microscopic Analysis of βγ-CAT Pore-forming Effect on Human Erythrocyte Membrane

LIU Shu-bai[1,2,#], HE Ying-ying[1,2,#], QIAN Jin-qiao[1,2,3], ZHANG Yun[1,*]

(1. *Biotoxin Units, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan* 650223, *China*；2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*；3. *Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming Yunnan* 650032, *China*)

Abstract: βγ-CAT is a naturally existing multifunctional protein complex of non-lens βγ-crystallin and trefoil factor from *Bombina maxima* skin secretions. In this paper, we first analysed the time-response curve of hemolysis and intracellular potassium efflux induced by βγ-CAT on human erythrocytes. After βγ-CAT (3nmol/L) in human erythrocytes was treated at 37℃ for 5min, we found that about 93.31±5.89% (P<0.01) of the intracellular potassium ions leaked, whereas the percentage of hemolysis was only13.12±1.92 % (P<0.05). We employed electron microscopy to observe the erythrocytes' morphological changes and found erythrocytes were swollen and some had globular structures occurring on the cell surfaces, and fast releasing hemoglobins. These results indicated that the hemolytic effect of βγ-CAT on human erythrocyte membranes was due to intracellular potassium ion's rapid efflux. These results demonstrate morphological proof in understanding the mechanism of βγ-CAT pore-forming effect on human erythrocytes.

Key words: Trefoil factor; Non-lens βγ-crystallin; βγ-CAT; Pore-forming protein; Scanning electron microscopy; Transmission electron microscopy

晶状体蛋白最早为 Mörner (1893)发现于脊椎动物眼睛晶状体中，含量占眼球晶状体总质量的

收稿日期：2008-04-22；接受日期：2008-06-02
基金项目：国家自然基金 (30630014；30570359)；中国科学院重要研究方向基金 (KSCX2-YW-R-088)
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn
#并列第一作者: 刘树柏 (1978-)，男，博士，研究方向为天然活性蛋白和多肽的药理学研究，E-mail:liutonny@hotmail.com；何英英 (1979-)，女，博士，研究方向为天然活性蛋白和多肽的药理学研究，E-mail: peard_liu@hotmail.com

30%—35%，因其作为一种在眼球中广泛分布的水溶性结构蛋白而命名为晶状体蛋白。晶状体蛋白分为 α、β、γ 晶状体三类，每一类晶状体蛋白由一系列蛋白组成一个超家族(Graw, 1997；Piatigorsky, 1981; Bloemendal, 1982)。β，γ-晶状体蛋白因为含有相同的希腊钥匙模体(Greek key motifs)而将它们归为 βγ-晶状体蛋白超家族。α、β、γ 三类晶状体蛋白在基因结构，表达调节模式，生理功能及相关疾病的发生等方面存在着很大的差别。眼球中 βγ-晶状体蛋白的 N-端和 C-端氨基酸的突变会导致眼球发生白内障(Graw, 1997; Malinowski & Manski, 1980)。βγ-晶状体蛋白在眼球的发育过程中可能参与调节眼球血管稳定，再造和凋亡，但是具体的作用机制和功能不清(Zhang et al, 2005a)。最近研究表明，在眼球晶状体之外也检测到有 α、β、γ 三类晶状体蛋白的表达。非晶状体 α-晶状体蛋白属于小热休克蛋白超家族，主要作为分子伴侣，具有自我激活的酶活性，参与 γ 晶状体基因的激活，与神经系统功能失调具有协同相关性(Ganea, 2001; Narberhaus, 2002; Reddy et al, 2006)。非晶状体 βγ-晶状体蛋白超家族蛋白从微生物到高等哺乳动物都有报道(Wistow & Piatigorsky, 1988; Bhat, 2004)，包括微生物来源的应急蛋白和脊椎动物中的非晶状体 βγ-晶状体蛋白，例如 Protein S (Nelson & Zusman, 1983)，Spherulin 3a (Nelson & Zusman, 1983; Rosinke et al, 1997)，来源于四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)的转运蛋白（cargo proteins）(Haddad et al, 2002)，表皮分化特异蛋白（epidermis differentiation-specific proteins，EP37) (Takabatake et al, 1992; Wistow et al, 1995; Ogawa et al, 1997)和哺乳动物中的黑色素瘤缺失蛋白(absent in melanoma 1, AIM1) (Ray et al, 1997; Teichmann et al, 1998)。目前研究发现 EP37 参与了两栖动物蝾螈(*Cynops pyrrhogaster*)胚胎发育中的表皮，皮肤腺体和消化道上皮的发育和分化(Ogawa et al, 1997; Ogawa et al, 1998)。Northern 印迹分析表明，AIM1 在胚胎发生过程中受时空的调节，大量表达于毛囊轴区、假定的胚盘和成体的皮肤、肺、心脏、肝和肾等器官，而在恶性黑色素瘤细胞和黑色素细胞前体细胞中均未表达缺失，提示 AIM1 在胚胎发育和抑制恶性皮肤肿瘤具有重要的作用(Ray et al, 1997; Teichmann et al, 1998)。但是，目前对于脊椎动物中的非晶状体 βγ-晶状体蛋白的生化特性，生物学功能和分子作用机制的相关信息了解尚少。

三叶因子(trefoil factor family，TFF)为一类含有保守三叶因子结构域(因含有三个环状结构形似三叶草而得名)的分泌性蛋白质。三叶因子结构域(trefoil factor domain，又称为 P-domain)为一个具有 C-X9-10-C-X9-C-X4-C-C-X10-C(C 代表半胱氨酸残基, X 为任意氨基酸残基)序列结构特征的大约 40 个氨基酸残基组成的结构区域，其中 6 个半胱氨酸残基以 1—5，2—4，3—6 的模式形成三对保守的二硫键(Sands & Podolsky, 1996; Thim, 1997)。自从第一个三叶因子 pS2/TFF1 于 1982 年在哺乳动物肿瘤细胞 MCF7 筛选雌激素诱导的乳腺癌易感基因相关研究中被发现，正式开始了对这一家族蛋白质的相关研究，新的三叶因子不断被发现(Maslov & Chunaev, 1982; Wong et al, 1999)。在两栖动物非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)和大蹼铃蟾中分别发现了不同类型三叶因子，例如含有 1 个三叶因子结构域的 xP1(Hauser & Hoffmann, 1991)，含有 2 个三叶因子结构域的 xP2(Hauser et al, 1992)和 Bm-TFF2 (Zhang et al, 2005b)，含有 3 个三叶因子结构域的 βγ-CAT 的 β 亚基(Liu et al, 2008)和含有 4 个三叶因子结构域的 xP4(Hauser & Hoffmann, 1991)。在哺乳动物中，已经发现了 3 类三叶因子：TFF1、TFF2 和 TFF3。TFF1 和 TFF3 含有 1 个三叶因子结构域，如人源 hTFF1；TFF2 含有 2 个三叶因子结构域，如 rTFF2(Suemori et al, 1991; Labouvie et al, 1997; Taupin & Podolsky, 2003; Thim & May, 2005)。三叶因子主要表达和分泌于表皮细胞的粘液腺，如胃肠消化道，支气管和尿道等，认为具有刺激细胞迁移，促进创伤修复等功能。但是，在一些腺癌患者中，三叶因子表现出高水平和异位表达(Lefebvre et al, 1996; Taupin & Podolsky, 2003)。在三叶因子基因敲除的小鼠中，肿瘤发生率升高，因此推测三叶因子参与了肿瘤发生，但是详细的分子作用机制还不清楚。

孔道形成蛋白(pore-forming proteins, PFPs)为一类自然界中广泛分布于真核生物和原核生物中的能够在细胞表面形成孔道的蛋白质(Parker & Feil, 2005)，例如哺乳动物中的补体，细胞毒 T-细胞分泌的穿孔素，细胞凋亡相关的 BCL2 家族蛋白，金色葡萄球菌分泌的 α-溶血素和产气芽孢杆菌(*Aeromonas hydrophila*)分泌的 Aerolysin (Tomita et al, 2004; Parker & Feil, 2005)。孔道形成蛋白具有两

种存在形态：在水溶液中以单体稳定存在和在细胞膜上以多聚体形成孔道。孔道形成蛋白首先通过与细胞膜上特异受体(蛋白，脂类和糖类及其衍生物)结合，通过相互作用启动一系列的变构过程，从水溶液相转变为细胞膜相，从单体转变成寡聚体(Parker & Feil, 2005)。一部分孔道形成蛋白仅在细胞膜上形成孔道，例如从蚯蚓体液中分离的 Lysenin (Yamaji et al, 1998)。一部分孔道形成蛋白在细胞膜上形成孔道后能够诱导细胞内吞，通过细胞内的内吞途径逆行转运到特定的亚细胞器发挥作用，例如幽门螺旋杆菌囊泡化毒素 VacA 转运到线粒体诱导细胞凋亡 (Cover & Blanke, 2005)。细菌来源的孔道形成蛋白与很多细菌性感染疾病密切相关，因此目前孔道形成蛋白相关研究主要集中于孔道形成蛋白在宿主细胞膜形成孔道的作用机制，以及在亚细胞致死浓度下宿主细胞所产生的炎症反应与感染疾病相关的信号通路和调节机制（Parker & Feil, 2005）。同时由于孔道形成蛋白能够与细胞膜上特异靶点结合，通过变构在细胞膜上组装形成特异性孔道。因此孔道形成蛋白又可作为细胞生物学中探索细胞膜结构和细胞内新的转运途径的高效，专一的研究工具和模型(Schiavo & van der Goot, 2001; Montoya & Gouaux, 2003)。

大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)为一类中国西南山区特有的两栖动物，生活环境非常恶劣，其皮肤分泌物对小鼠具有强烈致死活性(Zhang, 2006)。最近，我们从大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离纯化一个全新的天然分子量为 72kDa的非晶状体βγ晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物(non-lens βγ-crystallin and trefoil factor complex, βγ-CAT) (Liu et al, 2008)。βγ-CAT的α-亚基和β-亚基通过非共价键连接以$\alpha\beta_2$的分子形式存在。βγ-CAT的α-亚基属于非晶状体βγ晶状体蛋白家族，与蝾螈(*Cynops pyrrhogaster*)表皮分化蛋白EP37和人源黑色素瘤缺失蛋白AIM1具有很高的序列相似度。βγ-CAT的β亚基含有 3 个三叶因子结构域，为世界上第一次报道，与人源三叶因子hTFF2 和hTFF3 具有很高的相似度(Liu et al, 2008)。βγ-CAT能够通过孔道形成作用在人源红细胞膜上形成孔径为 2.0 nm的孔道，使红细胞内钾离子迅速外流引起胶体渗透压改变而溶血。Western blotting分析表明βγ-CAT的α亚基能够在红细胞膜上寡聚形成分子量大于 240 kDa的大分子寡聚体(Liu et al, 2008)。本文通过测定βγ-CAT处理红细胞引起的细胞内钾离子外流与溶血作用的时效曲线，结合扫描电子显微镜和透射电子显微镜分析βγ-CAT处理人源红细胞膜所引起的早期形态学变化。结果表明，βγ-CAT在红细胞膜上形成孔道使细胞内钾离子迅速外流，导致红细胞内胶体渗透压降低，大量水进入使红细胞迅速膨胀从而快速释放血红蛋白是导致红细胞裂解的主要原因，为进一步理解βγ-CAT的溶血机制提供了直接的形态学证据。

1 材料方法

1.1 天然 βγ-CAT 的分离纯化

天然非晶状体 βγ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物(βγ-CAT)的分离纯化流程详见(Liu et al, 2008)，其简略步骤如下：取 0.5 g 皮肤分泌物冻干粉溶于 10.0 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.3，含 150 mmol/L NaCl 和 5 mmol/L EDTA)，4 ℃透析过夜。经离心处理(5000 r/min，4℃，20 min)，取上清液按照(Liu et al，2008)文中所报道的分离纯化流程，分别上样于预先平衡好的 DEAE Sephadex A-50 离子交换柱(Pharmacia, 2.6 cm×50 cm)，AKTA Sephadex superfine G-100 分子筛层析柱(2.6 cm×100 cm，流速为 0.2 mL/min)和 AKTA Mono-Q HR5/5 阴离子交换柱(20 mmol/L Tris-HCl，pH 8.8，流速为 1.0 mL/min),根据 280 nm 的光吸收值收集各阶段的 βγ-CAT 分离峰。纯化的天然 βγ-CAT 小量分装后于 -20 ℃低温保存备用。纯化的天然 βγ-CAT 根据 BIO-RAD 公司的 PROTEIN ASSAY KIT 进行蛋白定量测试，采用牛血清白蛋白作为标准蛋白，测定浓度梯度标准曲线。

1.2 诱导人源红细胞胞内钾离子外流和红细胞溶解活性的测定

取健康志愿者的全血(来源于云南省血液中心，经 4%肝素抗凝处理)，用HBSS (Hank’s balanced salt solution, $MgSO_4$ 0.6 mmol/L，KCl 5.4 mmol/L，$CaCl_2$ 1.3 mmol/L，$MgCl_2$ 0.5 mmol/L，Glucose 5.6 mmol/L，NaH_2PO_4 0.4 mmol/L，$NaHCO_3$ 4.2 mmol/L，NaCl 137 mmol/L，Na_2HPO_4 0.3 mmol/L，pH7.4)缓冲液进行 3 次洗涤(500×*g*离心，5 min，4℃)，去除上层悬浮杂细胞。采用血球计计数，并将洗涤好的红细胞用HBSS缓冲液调整为 5×10^9 cells/mL的细胞悬液备用。洗涤好的红细胞(反应体积为 1.0 mL)加入βγ-CAT(3.0 nmol/L)于 37℃孵育不同时间，然后离心处理(20000×g，5 min，4℃)，取上清液一部分测定

415nm光吸收值, Tris-HCl溶液作为阴性对照；另一部分上清液，采用 6400A火焰分光光度仪检测钾离子浓度，已知浓度的KCl溶液作为标准品校准(采用去离子水调节零点，70μmol/L KCl标准液定标 80%来调节满度)。使用火焰分光光度仪检测钾离子时，先预热仪器 30min，待火焰稳定后先用去离子水冲洗管道 20min，再开始调整满度和校正零刻度，经过 4 次校准调节后开始测量。连续测量 15 个样，校正一次。红细胞内总的钾离子浓度和 100%溶解所释放的血红蛋白标准通过 1% Triton X-100 裂解相同检测体系的细胞来测定，参照(Liu et al, 2008)所述分别计算溶血率和细胞内钾离子外流的百分比。

1.3 扫描电镜分析

扫描电镜分析红细胞膜表面的实验流程为: 将洗涤好的人源红细胞(5×10^9 cell/mL)与βγ-CAT(3.0 nmol/L)37℃孵育 5min，采用含 3.5%戊二醛的 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4)于室温下前固定 30min，然后将固定细胞吸附在经多聚赖氨酸处理的盖玻片上，经 1%锇酸进行后固定，再采用乙醇和丙酮进行梯度脱水(30%，50%，70%，90%，100%)，然后将样品置于-20℃干燥并于-10℃冻干。干燥后的样品经离子肼喷镀上Pa/Pt，Hitachi 300-N型扫描电镜进行观察。

1.4 透射电镜分析

透射电镜分析红细胞的实验流程为：将经洗涤好的人源红细胞(5×10^9 cell/ mL)与βγ-CAT (3.0 nmol/L)于 37℃孵育 5min，离心处理(500×*g*，4℃，5min)后弃上清液，用含 3.5%戊二醛的 0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4)室温下前固定 30min，然后采用1%锇酸室温进行后固定 45min，再采用丙酮进行梯度脱水(30%，50%，70%，90% and 100%)，树脂(epoxy resin，Epon-618)包被过夜。包埋好的样品经LKB-II Ultracut切片机进行切片，然后经醋酸双氧铀和柠檬酸铅重金属双染，真空干燥后，采用Hitachi TEM-1011 透射电镜进行观察。

1.5 数据统计分析

实验数值表示为平均值±标准误，采用双尾 *t*-检验进行统计差异分析，$P<0.05$ 为具有统计显著性差异。

2 结 果

2.1 βγ-CAT 诱导人源红细胞胞内钾离子外流与溶血的时效关系

如图 1 所示，人源红细胞(5×10^9 cells/mL) 经βγ-CAT (3nmol/L)于 37℃处理 5min，（93.31±5.89）%的细胞内钾离子迅速外流($P<0.01$)，相应的红细胞溶解率为（13.12±1.92）% ($P<0.05$)。孵育时间延长到 30min，（102.35±5.03）% 的细胞内钾离子外流，红细胞溶解率增加到(28.50±1.33)%。βγ-CAT的孵育时间延长为 180min，红细胞溶解率增加到（42.14±3.65）%，（99.55±4.29）%的细胞内钾离子外渗。

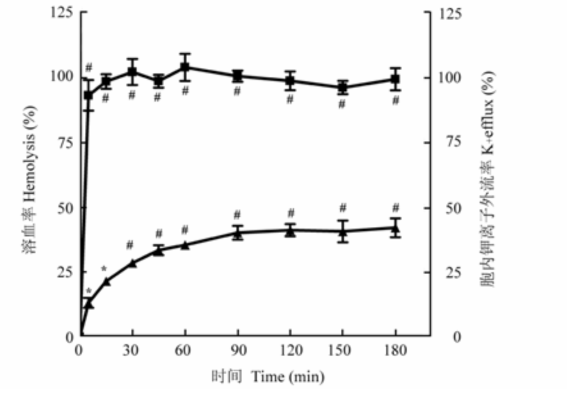

图 1 βγ-CAT 诱导人源红细胞胞内钾离子外流与溶血的时效曲线

Fig. 1 The time curve of βγ-CAT induced K^+ efflux and hemolysis effect on human erythrocyte

结果表示为平均值±标准误，■: 胞内钾离子外流率，▲: 溶血率 (Data were expressed as means±SE. ■: K+ efflux, ▲: Hemolysis)。
*$P<0.05$，#$P<0.01$。

2.2 扫描电镜观察

βγ-CAT (3nmol/L)37℃处理人源红细胞(5×10^9 cells/mL) 5min，通过扫描电子显微镜观察发现红细胞形态发生明显变化，细胞肿胀，体积增加，部分细胞膜表面出现棘状异常突起并破裂(如图 2A中箭头所示)。在较高放大倍数下，观察到细胞膜上的棘状异常突起呈火山口状缺口(如图2B和图2C中箭头所示)，部分肿胀细胞正通过棘状突起缺口向外迅速喷射血红蛋白(如图 2D中箭头所示)。在相同实验条件下，阴性对照组的红细胞的形态没有发生明显的变化。

2.3 透射电镜观察

βγ-CAT (3 nmol/L)37℃处理人源红细胞(5×10^9 cells/mL) 5min，通过透射电子显微镜观察发现红细胞膜表面向细胞外形成芽孢状突起，部分突起已经破裂，细胞内血红蛋白通过突起缺口向细胞外喷射

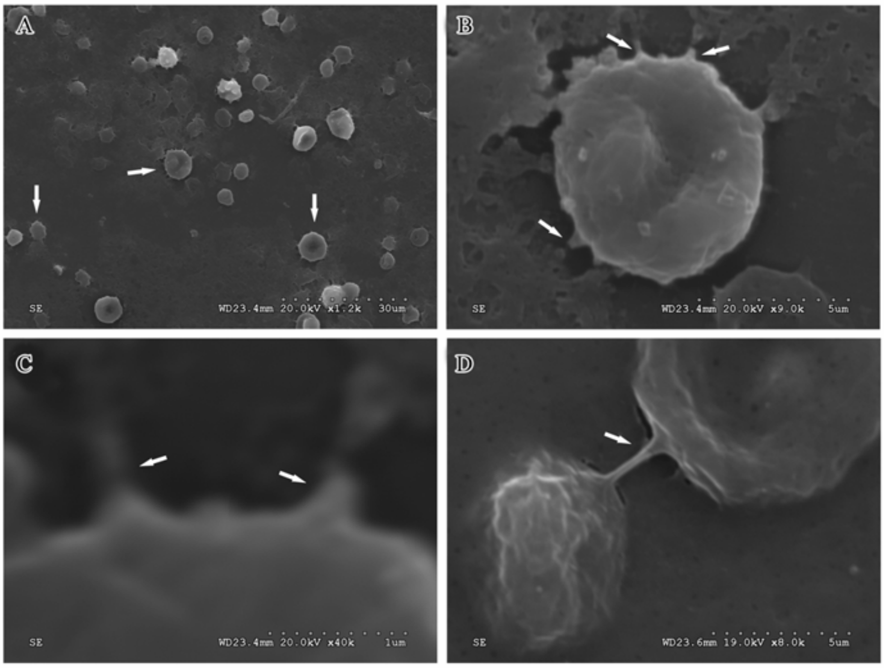

图 2　扫描电子显微观察 βγ-CAT 处理引起的人源红细胞的形态学变化

Fig. 2　Scanning electron microscopy observed the morphological changes of βγ-CAT treated human erythrocytes

不同视野的放大倍数如图中比例尺所示 (magnifications of among A－D panels were indicated by the scale bars)。

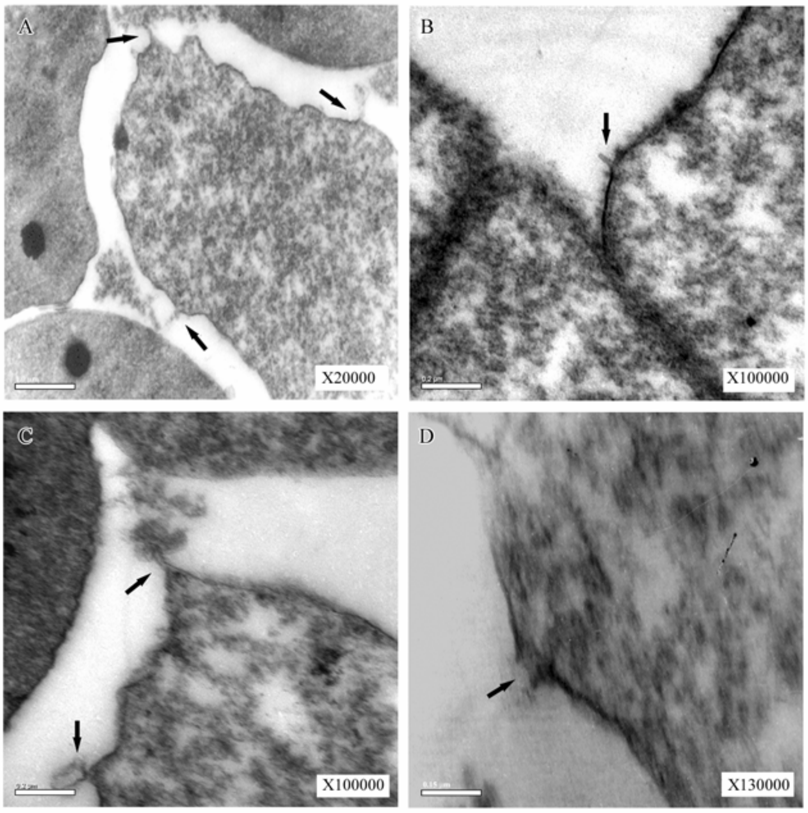

图 3 透射电子显微观察 βγ-CAT 处理引起的人源红细胞的形态学变化

Fig. 3　Transmission electron microscopy micrographs of βγ-CAT treated human erythrocyte

不同视野的放大倍数如图中比例尺所示 (magnifications of among A－D panels were indicated by the scale bars)。.

(如图 3A－C 中箭头所示)。在较高放大倍数下(图 3C，10 万倍放大;图 3D，13 万倍放大)，可观察到芽孢状突起的环状缺口。通过内参标尺估测，环状。缺口的孔径大约为 20—50nm。在相同实验条件下，阴性对照组的红细胞的形态没有发生明显的变化

3 讨 论

孔道形成蛋白(pore-forming proteins，PFPs)从水溶液单体相向细胞膜多聚体相转变，在细胞膜上形成孔道一般包括以下几个阶段(Gouaux，1997)：孔道形成蛋白首先通过与细胞膜上特异受体(蛋白质、脂类和糖类及其衍生物)结合，通过相互作用，诱导孔道形成蛋白发生一系列的变构过程，在细胞膜上形成寡聚体，从水溶液相转变为细胞膜相。例如，细菌来源的胆固醇依赖的细胞溶解素 CDC 结合于细胞膜上胆固醇(Gilbert，2002)，海葵来源的孔道形成毒素 Lysenin 结合于细胞膜上的神经鞘磷脂(Mancheno et al，2003)，水螅来源的孔道形成毒素 Hydralysins 结合于细胞膜上的蛋白受体(Sher et al，2005)。孔道形成蛋白完成细胞膜结合和变构寡聚后，进一步变构，插入细胞膜并在细胞膜上形成一个跨膜孔道。不同来源的孔道形成蛋白形成的孔道孔径不一，从几个纳米到几百纳米不等，能够使细胞内的小分子(例如电解质离子，代谢产物等)外漏。由于细胞内的小分子外漏使细胞内的水势降低，导致细胞外的水分子顺水势迅速进入细胞内而使细胞被涨破，释放血红蛋白，产生溶血效应，因此这种溶血效应称之为胶体渗透压溶血(Sabirov et al, 1993)。

非晶状体 βγ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物(non-lens βγ-crystallin and trefoil factor complex, βγ-CAT)为一个从大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离纯化的全新的天然蛋白复合物(Liu et al, 2008)。βγ-CAT 的 α 亚基在一级序列上由两部分组成：N-端区域含有由 4 个希腊钥匙模体组成的两个 βγ 晶状体结构域(第 1—170 个氨基酸残基)，与 EP37L1 和 AIM1 具有很高的序列相似度。已有文献报道 β 晶状体具有从单体向多聚体相互转化的能力(Jaenicke & Slingsby，2001)，粘球菌分泌的非晶状体 βγ 晶状体 protein S 能够在应急状态下通过寡聚化形成保护性蛋白衣壳，保护细菌度过恶劣环境(Inouye et al, 1979)。C-端区域第 173—287 位氨基酸序列与细菌(*Clostridium perfringens*)来源的孔道形成蛋白毒素 ETX(epsilon toxin)中孔道形成结构域(第 118—209 位氨基酸序列)高度相似。因此 βγ-CAT 的 α 亚基在结构上具备了孔道形成蛋白所需的结构特征(Liu et al, 2008)。βγ-CAT 的前期相关研究表明 βγ-CAT 不与红细胞膜上常见的脂类(如胆固醇，磷脂，鞘磷脂等)和糖类分子(如半乳糖，海藻糖等)结合，提示可能与红细胞膜上的未知蛋白受体结合。

在本研究中，首先测定 βγ-CAT 处理红细胞引起的细胞内钾离子外流与溶血作用的时效曲线。从时效曲线可知 βγ-CAT (3nmol/L) 37℃处理红细胞 5 min,大约（93.31±5.89）%的细胞内钾离子迅速外流(与阴性对照相比，P<0.01)，对应的溶血率为（13.12±1.92）%(P<0.05)。延长孵育时间，红细胞溶解率随之增加。βγ-CAT 处理 180min，红细胞溶解率增加至（42.14±3.65）%。表明 βγ-CAT 在红细胞膜上形成孔道使细胞内钾离子迅速外流而改变细胞内渗透压是导致溶血的主要原因。根据上述实验结果，我们采用扫描电子显微镜和透射显微镜对 βγ-CAT (3nmol/L，37℃，5min)处理的红细胞进行观察，分析 βγ-CAT 在人源红细胞膜上形成孔道相关的早期形态学变化。扫描电子显微镜观察发现 βγ-CAT 处理后红细胞形态发生明显变化，体积增加，细胞肿胀，部分细胞膜表面出现棘状异常突起并有部分破裂(图 2A－B，箭头所示)。对红细胞放大 4 万倍观测，发现细胞膜上的棘状异常突起为火山口状缺口(图 2C，箭头所示)，部分肿胀细胞正通过棘状突起缺口向外迅速喷射血红蛋白(图 2D，箭头所示)。通过透射电子显微镜进一步观察发现，经过 βγ-CAT (3nmol/L，37℃，5min)处理的同时，红细胞膜表面绝大部分完整，少数红细胞表面向细胞外形成芽孢状突起。部分突起已经破裂，细胞内血红蛋白正通过突起缺口向细胞外喷射(图 3A－C，箭头所示)。 在高倍放大下(图 3C，10 万倍；图 3D，13 万倍)，通过内参标尺估测芽孢状突起的环状缺口的孔径大约为 20—50nm。

在 βγ-CAT 的前期相关研究中，通过渗透压保护实验测定 βγ-CAT 在人源红细胞膜上形成的孔道孔径为 2.0nm (Liu et al，2008)。在本试验中，由于电子显微镜的放大倍数和分辨率不够，因此推测通过内参标尺估测的芽孢状突起的环状缺口的孔径应该是在红细胞膜上涨破后形成的孔，而不是 βγ-CAT 在细胞膜上寡聚形成的孔道。

这些结果为理解 βγ-CAT 的孔道形成效应提供

了直接的形态学证据，表明 βγ-CAT 通过在红细胞膜上形成孔道使细胞内钾离子迅速外流导致红细胞内渗透压改变而溶血。同时，为进一步理解高等脊椎动物中非晶状体 βγ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白结构与功能的关系提供了新的线索。

致谢：衷心感谢昆明医学院电镜教研室的宋精玲女士在电镜分析实验中提供的技术帮助和支持。

参考文献：

Bhat SP. 2004. Transparency and non-refractive functions of crystallins-a proposal[J]. *Exp Eye Res*, **79** (6):809-816.

Bloemendal H. 1982. Lens proteins[J]. *CRC Crit Rev Biochem*, **12** (1):1-38.

Cover TL, Blanke SR. 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality[J]. *Nat Rev Microbiol*, **3** (4):320-332.

Ganea E. 2001. Chaperone-like activity of alpha-crystallin and other small heat shock proteins[J]. *Curr Protein Pept Sci*，**2**(3):205-225.

Gilbert RJC. 2002. Pore-forming toxins[J]. *Cell Mol Life Sci*, **59**(5): 832-844.

Gouaux E. 1997. Channel-forming toxins: Tales of transformation[J]. *Curr Opin Struct Biol*, **7**(4): 566-573.

Graw J. 1997. The crystallins: Genes, proteins and diseases[J]. *Biol Chem*, **378**(11): 1331-1348.

Haddad A, Bowman GR, Turkewitz AP. 2002. New class of cargo protein in *Tetrahymena thermophila* dense core secretory granules[J]. *Eukaryot Cell*, **1**(4): 583-593.

Hauser F, Hoffmann W. 1991. xP1 and xP4-P-domain peptides expressed in *Xenopus laevis* stomach mucosa[J]. *J Biol Chem*, **266**(31): 21306-21309.

Hauser F, Roeben C, Hoffmann W. 1992. Xp2, a new member of the P-domain peptide family of potential growth-factors, is synthesized in *Xenopus laevis* skin [J]. *J Biol Chem*, **267**(20): 14451-14455.

Inouye M, Inouye S, Zusman DR. 1979. Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development-specific protein of *Myxococcus xanthus*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**(1): 209-213.

Jaenicke R, Slingsby C. 2001. Lens crystallins and their microbial homologs: Structure, stability, and function[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **36**(5): 435-499.

Labouvie C, Machado JC, Carneiro F, Seitz G, Blin N. 1997. Expression pattern of gastrointestinal markers in native colorectal epithelium, lesions, and carcinomas [J]. *Oncol Rep*, **4**(6): 1367-1371.

Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. 1996. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein[J]. *Science*, **274**(5285): 259-262.

Liu SB, He YY, Zhang Y, Lee WH, Qian JQ, Lai R, Jin Y. 2008. A novel non-lens betagamma-crystallin and trefoil factor complex from amphibian skin and its functional implications [J]. *PLoS ONE*, **3**(3): e1770.

Malinowski K, Manski W. 1980. An immunochemical study of the different proteins in the beta and gamma crystallin families [J]. *Exp Eye Res*, **30** (5): 519-526.

Mancheno JM, Martin-Benito J, Martinez-Ripoll M, Gavilanes JG, Hermoso JA. 2003. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation[J]. *Structure*, **11**(11): 1319-1328.

Maslov VG, Chunaev AS. 1982. Study of primary photoprocesses in photosystem II of Chlamydomonas mutant strains by hole-burning spectroscopy[J]. *Mol Biol* (*Mosk*), **16**(3): 604-611.

Montoya M, Gouaux E. 2003. Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin[J]. *Biochim Biophys Acta -Biomembranes*, **1609**(1): 19-27.

Mörner CT. 1893. Untersuchungen der proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges[J]. *Z Physiol Chem*, **18**: 61-106.

Narberhaus F. 2002. Alpha crystalline type heat shock proteins: Socializing minichaperones in the context of a multichaperone network[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**(1): 64-93.

Nelson DR, Zusman DR. 1983. Transport and localization of protein S, a spore coat protein, during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*[J]. *J Bacteriol*, **154**(2): 547-553.

Ogawa M, Takabatake T, Takahashi TC, Takeshima K. 1997. Metamorphic change in EP37 expression: Members of the beta gamma-crystallin superfamily in newt[J]. *Dev Genes Evol*, **206**(7): 417-424.

Ogawa M, Takahashi TC, Takabatake T, Takeshima K. 1998. Isolation and characterization of a gene expressed mainly in the gastric epithelium, a novel member of the ep37 family that belongs to the betagamma-crystallin superfamily[J]. *Dev Growth Diff*, **40**(5): 465-473.

Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: From structure to function[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, **88**(1): 91-142.

Piatigorsky J. 1981. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features[J]. *Differentiation*, **19**(3): 134-153.

Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS, Trent JM. 1997. AIM1, a novel non-lens member of the betagamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(7): 3229-3234.

Reddy GB, Kumar PA, Kumar MS. 2006. Chaperone-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin[J]. *IUBMB Life*, **58** (11): 632-641.

Rosinke B, Renner C, Mayr EM, Jaenicke R, Holak TA. 1997. Ca^{2+}-loaded spherulin 3a from *Physarum polycephalum* adopts the prototype gamma-crystallin fold in aqueous solution[J]. *J Mol Biol*, **271**(4): 645-655.

Sabirov RZ, Krasilnikov OV, Ternovsky VI, Merzliak PG. 1993. Relation between ionic channel conductance and conductivity of media containing different nonelectrolytes：A novel method of pore-size determination[J]. *Gen Physiol Biophys*, **12**(2): 95-111.

Sands BE, Podolsky DK. 1996. The trefoil peptide family[J]. *Annu Rev Physiol*, **58**: 253-273.

Schiavo G, van der Goot FG. 2001. The bacterial toxin toolkit[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**(7): 530-537.

Sher D, Fishman Y, Zhang ML, Lebendiker M, Gaathon A, Mancheno JM, Zlotkin E. 2005. Hydralysins, a new category of beta-pore-forming toxins in Cnidaria[J]. *J Biol Chem*, **280**(24): 22847-22855.

Suemori S, Lynchdevaney K, Podolsky DK. 1991. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue-specific and cell-specific member of the trefoil protein family[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**(24): 11017-11021.

Takabatake T, Takahashi TC, Takeshima K. 1992. Cloning of an epidermis-specific *Cynops* cDNA from neurula library[J]. *Dev Growth Diff*, **34** (3): 277-283.

Taupin D, Podolsky DK. 2003.Trefoil factors: Initiators of mucosal healing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(9): 721-734.

Teichmann U, Ray ME, Ellison J, Graham C, Wistow G, Meltzer PS, Trent

JM, Pavan WJ. 1998. Cloning and tissue expression of the mouse ortholog of AIM1, a beta gamma-crystallin superfamily member[J]. *Mamm Genome*, **9**(9): 715-720.

Thim L. 1997. Trefoil peptides: from structure to function[J]. *Cell Mol Life Sci*, **53**(11-12): 888-903.

Thim L, May FEB. 2005. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights[J]. *Cell Mol Life Sci*, **62**(24): 2956-2973.

Tomita T, Noguchi K, Mimuro H, Ukaji F, Ito K, Sugawara-Tomita N, Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom Pleurotus ostreatus, assembles into a transmembrane pore complex[J]. *J Biol Chem*, **279**(26): 26975-26982.

Wistow G, Jaworski C, Rao PV. 1995. A non-lens member of the beta gamma-crystallin superfamily in a vertebrate, the amphibian Cynops[J]. *Exp Eye Res*, **61**(5): 637-639.

Wistow GJ, Piatigorsky J. 1988. Lens crystallins: The evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue[J]. *Annu Rev Biochem*, **57**: 479-504.

Wong WM, Poulsom R, Wright NA. 1999. Trefoil peptides[J]. *Gut*, **44**(6): 890-895.

Yamaji A, Sekizawa Y, Emoto K, Sakuraba H, Inoue K, Kobayashi H, Umeda M. 1998. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein[J]. *J Biol Chem*, **273**(9): 5300-5306.

Zhang C, Gehlbach P, Gongora C, Cano M, Fariss R, Hose S, Nath A, Green WR, Goldberg MF, Zigler JS, Sinha D. 2005a. A potential role for beta- and gamma-crystallins in the vascular remodeling of the eye[J]. *Dev Dyn*, **234**(1): 36-47.

Zhang J, Zhang Y, Wan SG, Wei SS, Lee WH, Zhang Y. 2005b. Bm-TFF2, a trefoil factor protein with platelet activation activity from frog *Bombina maxima* skin secretions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**(4): 1027-1033.

Zhang Y. 2006. Amphibian skin secretions and bio-adaptive significance: Implications from *Bombina maxima* skin secretion proteome[J]. *Zool Res*, **27**(1): 101-112.[张 云. 2006. 两栖类动物皮肤分泌物及其生物学适应意义——大蹼铃蟾皮肤分泌物蛋白质多肽组的启示. 动物学研究, **27**(1): 101-112.]

(上接第 502 页)

夜鹰双腿弱小，极少见在地面行走。但随着仲夏地面温度升高，幼鸟出壳 3－5 天后即被成鸟移动，有时移至巨石边，或者灌丛下。“幼鸟搬家”每日 3－5m，最远可离开原巢址 25－30m。这是一个奇怪的现象，有人认为夜鹰是用嘴来移动卵或雏鸟（Jackson, 2007）。笔者认为，这一方面是为了躲避日晒，另一方面也是为了避开人类活动的干扰（附近有公路、居民点、农田和牧群）。成鸟傍晚开始觅食和育雏，繁殖期间常发出持续不断的颤鸣声。

在新疆阜康、博乐等地有大量欧夜鹰及幼鸟被汽车撞死的记录。与其他夜行动物比较，其夜间躲避汽车和捕鸟网的能力比较差。

参考文献：

del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J. 1999. Handbook of the Birds of the World [M]. Barcelona: Lynx Edicions, Vol. 5: 360-361.

Jackson HD. 2007. A review of the evidence for the translocation of eggs and young by nightjars (Caprimulgidae). *Ostrich*, 78 (3): 561-572.

Ma M. 2001. A Checklist of the Birds in Xinjiang, China[M]. Beijing: Science Press, 35-36.

Tan YK, Guan GX. 2003. Fauna Sinica. Aves Vol. 7[M]. Beijing: Science Press, 9-11.